Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. P. Gedigk)

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Frühveränderungen in experimentellen Niereninfarkten bei der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg a. d. Lahn

vorgelegt von
Dietmar Runge
aus Höver (Kreis Uelzen)

Marburg 1968

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. P. Gedigk)

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Frühveränderungen in experimentellen Niereninfarkten bei der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg a. d. Lahn

vorgelegt von
Dietmar Runge
aus Höver (Kreis Uelzen)

Marburg 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Marburg
am: 16. Juli 1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert

Referent: Privatdozent Dr. med. G. Korb
Correferent: Prof. Dr. med. P. Gedigk

I N H A L T

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methodik	1
III.	Versuchsergebnisse	4
IV.	Diskussion	
	A) Welche licht- und fluoreszenzmikroskopischen Frühveränderungen konnten an experimentellen Niereninfarkten erhoben werden?	10
	B) Welche Übereinstimmungen bestehen zu fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen am experimentellen Herzinfarkt?	13
	C) Welche Schlüsse lassen sich aus der veränderten Anfärbbarkeit des Cytoplasmas während der Entstehung einer ischaemischen Infarktnekrose in der Niere ziehen?	14
V.	Zusammenfassung	16
	Literatur	17

I. Einleitung

Während über lichtmikroskopische und histochemische Veränderungen bei der Entstehung ischaemischer Niereninfarkte zahlreiche Veröffentlichungen vorliegen (u.a. RIBBERT, 1899; TÜRK, 1913; MÜLLER, 1938; GOEBEL, und PUCHTLER, 1954; GAVAN und KAUFMAN, 1956; HOLLE und Mitarbeiter, 1955; RUDOLPH und SCHOLL, 1958; SHEEHAN und DAVIS, 1958, 1959; EDER und WAGENMANN, 1959), liegt bisher nur eine Arbeit über fluoreszenzmikroskopisch erfaßbare Veränderungen vor. (MOLZ, 1956).

Bei dieser Sachlage hielten wir eine erneute fluoreszenzmikroskopische Untersuchung früher Infarktstadien in der Niere für lohnenswert, zumal in der Zwischenzeit mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere am Herzmuskel, neue Einblicke in den Ablauf der Nekrobiose gewonnen werden konnten (KORB, 1964). Dabei interessierte uns einmal das färberische Verhalten des Nierenparenchyms nach einer Fluorochromierung mit Acridinorange, zum andern sollten Übereinstimmungen und Abweichungen zu bekannten Befunden bei Herzinfarkten festgestellt werden.

II. Material und Methodik

1. Tierversuche

Bei 21 weiblichen Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200 g wurde durch eine Dauerunterbindung des caudalen Astes der Arteria renalis sinistra ein partieller Niereninfarkt erzeugt. Dabei gingen wir wie folgt vor:

In Äther-Sauerstoff-Narkose wurde bei rechter Seitenlage, 2 cm unterhalb des Rippenbogens beginnend, links paralumbal ein etwa 3 cm langer Hautschnitt gelegt und anschließend Muskeln, Fascien und Peritoneum durchtrennt. Danach mobilisierten wir die linke Niere durch einen leichten Zug am Netz. Nach einer Dekapsulation zur Ausschaltung einer kollateralen Blutversorgung wurden am Nierenhilus die beiden Hauptäste der Arteria renalis sinistra dargestellt und der caudale Ast mit einem Perlonfaden unterbunden. Der Erfolg dieses Eingriffs war an einer

sofort sichtbaren, relativ scharf abgrenzbaren Abblassung an der Oberfläche des caudalen Nierenpoles festzustellen. Anschliessend reponierten wir Netz und Niere und verschlossen Peritoneum, Fascien, Muskulatur und Haut durch fortlaufende Nähte.

Je drei Tiere wurden 30 Minuten, 1 Stunde sowie 2, 3, 4, 6 und 8 Stunden nach der Unterbindung durch Nackenschlag getötet.

2. Histologische Untersuchungen

A) Lichtmikroskopische Methoden:

Unfixierte (Messertiefkühlmethode) und formalinfixierte Gefrier- und Paraffinschnitte jeweils beider Nieren wurden in üblicher Weise mit Haematoxylin-Eosin und Sudan III/IV gefärbt.

B) Fluoreszenzmikroskopische Methoden:

Die Untersuchungen wurden mit einem Zeiss-Standard-Mikroskop durchgeführt, das mit einem HBO-200 Quecksilber-Höchstdruckbrenner ausgerüstet war. Die Filterkombination setzte sich aus BG 12 und OG 1 Filtern zusammen.

a) Fluorochromierung mit Astraphosphin (APH):

Unfixierte Schnitte kurz wässern. 10 Minuten mit einer wässrigen Astraphosphin-Lösung einer Konzentration von 1 : 1 000 färben. 5 bis 10 Minuten mit einer Mischung von Leitungswasser und destilliertem Wasser (Mischungsverhältnis 1 : 1) spülen, eindecken und mit Paraffin umranden.

Ergebnis: Zellen und Zwischengewebe zeigen eine gleichmäßige schwach olivgrüne Sekundärfluoreszenz. Die Zellkerne stellen sich nicht dar. Selbst kleinste Ansammlungen von Fetttröpfchen sind durch eine intensive hellgrüne Sekundärfluoreszenz gut zu erkennen.

b) Fluorochromierung mit Acridinorange (AO):

Unfixierte Schnitte 5 bis 10 Minuten in eine farbstofffreie, hypertonische Michaelis-Puffer-Lösung eines pH-Wertes von 6,7 einbringen (20 ml Stammlösung, 8 ml 0,85 %ige NaCl-Lösung, 26 ml n/10 HCL). 10 Minuten mit Acridinorange färben (Konzentration 1 : 10 000; mit hypertonem Michaelis-Puffer auf 6,7 eingestellt). 10 Minuten mit hypertonischer Michaelis-Puffer-Lösung pH 6,7 spülen, danach eindecken und mit Paraffin umranden.

Ergebnis: In den Glomerula weisen die Kerne der Endothel- und Mesangiumzellen eine hellgrüne Sekundärfluoreszenz auf. Gleich gefärbt sind die Kerne der parietalen Kapselepithelien, deren Cytoplasma schwach grün bis grüngelblich leuchtet. Die Kerne der Epithelien von den Haupt- und Mittelstücken sind gelb gefärbt. Im dunkelgrünen Cytoplasma sind, - in den Haupt- mehr als in den Mittelstücken - feine orangerot leuchtende Granula und Schollen vorhanden. Da sie nach einer Behandlung mit Ribonuclease nicht mehr sichtbar sind, dürfte es sich hierbei, ähnlich wie in der Leber (ARMSTRONG, 1956; SCHÜMMELFEDER, 1949), um cytoplasmatische Ribonucleinsäuren handeln. Die Epithelien der Henleschen Schleife und der Sammelrohre sind durch ein schwach gelbgrünes Cytoplasma und hellgrüne Zellkerne gekennzeichnet. Granuläre Bestandteile konnten nicht festgestellt werden. Die kollagenen Fasern im Interstitium leuchteten schwach grasgrün. Mehrfach trifft man hier jeweils auf einzeln angeordnete Mastzellen mit zahlreichen kupferroten Cytoplasmagranula. Das Färbeergebnis entspricht damit weitgehend den bereits früher an normalen Nieren von DECKART und KORB (1962) erhobenen Befunden.

c) Intravitale Fluorochromierung:

Um zu prüfen, ob im Versorgungsbereich der unterbundenen Arterie eine völlige Ischaemie vorlag, stellten wir bei je einem Tier der einzelnen Versuchsgruppen die Nierendurchblutung dar. Dazu wurde den Tieren 5 Minuten vor Versuchsende eine 0,1 %ige, mit Sörensen-Puffer auf pH 7,2 eingestellte, Acridinorange-Lösung (0,5 ml/100 g Körpergewicht) langsam in

die rechte Vena femoralis injiziert (vergl. auch KORB, KRUG und BECHTELSHEIMER, 1965).

Von den sofort nach der Entnahme mit Kohlensäureschnee eingefrorenen Nieren haben wir dann mit dem Kyrostat 3o dicke Längsschnitte angefertigt. Die Beurteilung erfolgte mit einer Photoeinrichtung für Makroaufnahmen (Leitz-Aristophot), die mit einem HBO 2oo Quecksilber-Höchstdruckbrenner ausgerüstet war. Die Filterkombination setzte sich aus BG 12 und OG 1 Filtern zusammen.

Ergebnis: Intravital durchblutete Nierenanteile sind durch eine intensiv grüngelbliche Sekundärfluoreszenz gekennzeichnet. In der Ischaemiezone ließ sich dagegen mit Ausnahme einer ganz schmalen subkapsulären Zone nur eine schwache mattgrüne Eigenfluoreszenz nachweisen. Damit ergaben sich keine Hinweise für eine sofort wirksam werdende kollaterale Blutversorgung.

III. Versuchsergebnisse

Dauer der Unterbindung: 30 Minuten

Makroskopisch (M): Das Versorgungsgebiet der unterbundenen Arterie hebt sich an der Oberfläche durch eine graurote, auf der Schnittfläche durch eine dunkelrote Farbe scharf von der Umgebung ab.

Lichtmikroskopisch (Lm): Im Ischaemiebereich fällt lediglich eine geringe Weitstellung der Hauptstücklumina auf.

Fluoreszenzmikroskopisch (Fm): Die Hauptstückepithelien zeigen im Infarktgebiet eine braune bis braunrötliche Cytoplasmafluoreszenz. Dadurch hebt sich die geschädigte Zone - jedenfalls im Rindengebiet - verhältnismäßig gut von der Umgebung ab. An den Glomerula und im Mark sind keine wesentlichen Veränderungen festzustellen.

Dauer der Unterbindung: 1 Stunde

M: Wie nach 30 Minuten ist die Nierenoberfläche im Infarktbereich graurötlich; auf der Schnittfläche dagegen dunkelrot gefärbt.

Lm: Die Erweiterung der Hauptstücklumina mit entsprechender Vergrößerung des Tubulusquerschnittes ist deutlicher ausgeprägt. Die Epithelien zeigen hier eine auffallende Schwellung; ihr Cytoplasma weist besonders in unfixierten Schnitten eine verringerte Eosinophilie auf. Hin und wieder trifft man auf kleine vakuolige Aufhellungen. In den Kapselräumen der Glomerula sind mehrfach homogene, mit Eosin schwach rot angefärbte, sichelförmige Gebilde vorhanden, die mitunter das Kapillarknäuel gering komprimieren und es zum Gefäßpol verdrängen. Das Interstitium ist in herdförmigen Bezirken ödematös aufgelockert.

Fm: Deutlicher als nach 30 Minuten und mit scharfen seitlichen Grenzen hebt sich in der Rinde der Infarkt durch eine braunrötliche Cytoplasmafluoreszenz der Hauptstückepithelien und eine Weitstellung der Lichtungen ab. Nur verhältnismäßig selten stellen sich in den Epithelzellen noch rötliche Granula dar. Die Kerne leuchten weiterhin gelb. Die Sekundärfluoreszenz der Glomerula sowie der Epithelien der Henleschen Schleife und der Sammelröhren ist unverändert. Die auch lichtmikroskopisch nachweisbaren sichelförmigen Strukturen in den Kapselräumen der Glomerula besitzen eine rötliche Farbe und sind von auffallend gleichem fluoreszenzmikroskopischen Verhalten wie die benachbarten Hauptstücke.

Dauer der Unterbindung: 2 Stunden

M: Auch die Oberfläche der Infarkte zeigt jetzt eine dunkelrote Farbe.

Lm: An der Infarktperipherie lassen sich in einer schmalen Zone die Hauptstückepithelien nur schlecht voneinander abgrenzen. Sie weisen eine homogene Umwandlung des Cytoplasmas auf, das in unfixierten Schnitten außerdem durch eine gesteigerte Eosinophilie gekennzeichnet ist. Im Zentrum dagegen ist die Anfärbbarkeit der Hauptstückepithelien mit Eosin weiterhin herabgesetzt. Mehrfach trifft man in den Epithelien auf unterschiedlich große Vakuolen. Gelegentlich wölben sich sogenannte Kuppenblasen in die Lichtungen vor. Die Kerne sind teils unverändert, teils pyknotisch. In den Kapselräumen der Glomerula finden sich jetzt häufiger halbmondförmige, homogene Einlagerungen mit Kompression und Verlagerung des Kapillarknäuels. Die ödematöse Auflockerung des Interstitiums hat zugenommen. An den Tubuli der Markregion lassen sich weiterhin keine sicheren Veränderungen feststellen.

Fm: In der Infarktperipherie besitzen die Hauptstückepithelien ein homogenes oder scholliges Cytoplasma mit einer gleichmäßigen grünen Sekundärfluoreszenz. Granula sind nicht mehr vorhanden. Die Kerne leuchten in den Hauptstückepithelien meist mattgrün. Im Infarktzentrum ist das Cytoplasma der Hauptstückepithelien dagegen weiterhin braunrötlich gefärbt.

Dauer der Unterbrechung: 3 Stunden

M: Die Infarkte sind dunkelrot gefärbt. Die ganze Niere ist gegenüber der Kontrollniere vergrössert.

Lm: An der Peripherie der Infarkte fällt weiterhin eine gesteigerte Eosinophilie der Hauptstückepithelien auf. Diese Veränderung, die sich nach wie vor nur in unfixierten Schnitten darstellt, nimmt eine Breite von etwa 2 bis 3 Tubuli ein. Die Zellkerne sind vielfach pyknotisch.

Fm: Entsprechend der Zone, die lichtmikroskopisch durch eine gesteigerte Eosinophilie gekennzeichnet ist, stellen sich die Hauptstückepithelien mit einer homogenen grasgrünen Cytoplasmafluoreszenz dar. Die Infarkte heben sich dadurch deutlich vom nichtgeschädigten Parenchym ab. Im Infarktzentrum ist das Cytoplasma der Hauptstücke nach wie vor braunrötlich gefärbt. Ohne daß eine Farbänderung vorliegt, hat die Intensität der Kernfluoreszenz in den Glomerula und Tubulusepithelien der Markzone abgenommen.

Dauer der Unterbindung: 4 Stunden

M: Die Oberfläche der jetzt gelbrot gefärbten Infarkte ist flach vorgewölbt.

Lm: In den Lichtungen der Hauptstückepithelien sind immer noch Eiweißniederschläge zu erkennen. Die Basalmembran der Glomerula erscheinen geringfügig verdickt. Das Interstitium weist eine deutliche ödematöse Auflockerung auf. Stellenweise sind kleine Haemorrhagien nachweisbar.

Fm: In der Infarktperipherie zeigen die Hauptstückepithelien in einer breiten Zone eine leuchtend grasgrüne, im Zentrum weiterhin eine rötlichbraune Fluoreszenz. Die Intensität der Kernfluoreszenz hat allenthalben weiterhin abgenommen. In den an der Peripherie gelegenen Hauptstückepithelien heben sich nur noch sel-

ten Zellkerne ab. In den Lichtungen der Glomerula und der Hauptstücke sind rötliche Niederschläge vorhanden; sie haben sich an einigen Stellen durch defekte Basalmembranen in das umgebende Interstitium ausgebreitet. Entlang der Infarktgrenzen stellen sich in sonst unveränderten Hauptstückepithelien an der Basis feine Fetttröpfchen dar.

Dauer der Unterbindung: 6 Stunden

M: Die Infarktnieren sind deutlich vergrößert. Die Oberfläche ist über den Infarkten vorgewölbt. Durch eine gelbrote Schnittfläche lassen sich die Infarkte verhältnismäßig gut abgrenzen.

Lm: In einer breiten Zone an der Infarktperipherie fällt in unfixierten, weniger deutlich jetzt auch in fixierten Schnitten, eine gesteigerte Eosinophilie der Hauptstückepithelien auf. Kerne heben sich kaum noch ab. Die Lichtungen der Hauptstücke sind nicht mehr erweitert; sie enthalten oft abgelöste Epithelzellgruppen und Zellfragmente. Die Epithelien der Henleschen Schleifen und der Sammelröhren lassen sich schlecht abgrenzen; sie sind häufig homogen und zum Teil auch schollig umgewandelt. Auch hier ist eine leicht gesteigerte Eosinophilie des Cytoplasmas nachweisbar. An den Infarkträndern sind erstmals lockere leukocytäre Infiltrate zu erkennen.

Fm: Im Markbereich zeigt das Cytoplasma der an der Infarktgrenze gelegenen Tubuli jetzt eine ebenfalls grüne Sekundärfluoreszenz. Im Zentrum der Infarkte leuchtet dagegen das Cytoplasma der Epithelzellen weiterhin braun bis braunrot.

Dauer der Unterbindung: 8 Stunden

M: Die Infarkte sind gelbrötlich gefärbt. Die ganze Niere ist größer als die der anderen Seite.

Lm: Bis auf eine Zunahme der leukozytären Infiltrate entlang der Infarktperipherie stellen sich keine neuen Veränderungen dar.

Fm: Anstelle der Hauptstückepithelien findet man in einer breiten Zone an der Infarktperipherie nur noch homogene, grasgrün leuchtende, kernlose Bänder, die stellenweise keinen Kontakt mehr mit der noch erhaltenen Basalmembran besitzen.

Im Zentrum lassen sich nach wie vor braunrot leuchtende Hauptstückepithelien ebenfalls kaum noch voneinander abgrenzen; doch sieht man hier noch häufig mattgelb gefärbte Zellkerne.

Entlang der Infarktgrenze sind in einer schmalen Zone sonst unveränderte Epithelzellen deutlich verfettet.

IV. Diskussion

A) Welche licht- und fluoreszenzmikroskopischen Frühveränderungen konnten am experimentellen Niereninfarkt erhoben werden?

L i c h t m i k r o s k o p i s c h fand sich

30 Minuten nach der Unterbindung im Ischaemiebereich eine Weitstellung der Haupstücke, die in den nächsten Stunden deutlicher ausgeprägt war.

Nach 1 Stunde fiel zusätzlich eine Schwellung der Hauptstückepithelien auf, wobei die Tubulusquerschnitte vergrößert erschienen. Die Epithelien wiesen gleichzeitig in unfixierten Schnitten eine herabgesetzte Eosinophilie des Cytoplasmas auf. In den Glomerula stellten sich halbmondförmige, schwach eosinophile Eiweißniederschläge dar. Hierbei handelt es sich um Anteile der geschwollenen und regressiv veränderten Hauptstückepithelien, die in die Bowman'schen Kapselräume verlagert sind, sogenannte "infraglomerulärer Epithelreflux" (WAUGH und BESCHEL, 1961). Das Interstitium war herdförmig oedematös aufgelockert.

Nach 2 Stunden ließen sich in den peripheren Abschnitten der ischaemischen Zone die Hauptstückepithelien nur noch schlecht voneinander abgrenzen. Sie zeigten eine unterschiedlich stark ausgeprägte homogene Umwandlung des Cytoplasmas. Außerdem stellte sich, insbesondere in unfixierten Schnitten, anstelle einer verminderten eine gesteigerte Cytoplasmaeosinophilie dar. Im Zentrum dagegen färbte sich das Cytoplasma der Hauptstückepithelien weiterhin nur auffallend schwach mit Eosin an. Häufig hatten sich hier besonders in den Hauptstückepithelien Vakuolen und sogenannte Kuppenblasen ausgebildet (vergl. auch HOLLE und Mitarbeiter, 1955; TOTOVIĆ, 1966). Mehrfach waren die Kerne pyknotisch. Das interstitielle Oedem hatte zugenommen.

Nach 3 Stunden fand sich in einer peripheren - etwa 2 bis 3 Tubuli breiten - Zone eine deutlich gesteigerte Cytoplasmaeosinophilie. Die Zahl der Kernpyknosen hatte insgesamt zu-

Nach 4 Stunden fiel mitunter eine leichte Verdickung der glomerulären Basalmembran auf. In dem weiterhin oedematösen Interstitium waren kleinere Haemorrhagien festzustellen.

Nach 6 Stunden hatte sich die periphere Zone mit einer - jetzt auch im formalinfixierten Material nachweisbaren - gesteigerten Cytoplasmaeosinophilie der Hauptstückepithelien deutlich verbreitert. Die Lichtungen waren nur noch stellenweise erweitert; sie enthielten häufig abgelöste, regressiv veränderte Epithelgruppen oder Zellfragmente. Gleichartige Veränderungen sah man jetzt auch an der Peripherie der von der Ischaemie mitbetroffenen Markzone. Außerdem sah man jetzt entlang der Infarktperipherie lockere Leukozytenansammlungen, deren Dichte in den nächsten Stunden zunahm.

Die beschriebenen lichtmikroskopischen Veränderungen stimmen somit weitgehend mit bereits von anderen Autoren erhobenen Befunden überein. Dies gilt insbesondere für die frühzeitig nachweisbare Weitstellung der Hauptstücktubuli (HOLLE und Mitarbeiter, 1955; SHEEHAN und DAVIS, 1958, 1959; RUDOLPH und SCHOLL, 1958), die verminderte Anfärbbarkeit des Cytoplasmas mit Eosin (SHEEHAN und DAVIS, 1958), sowie die Entstehung von Cytoplasmavakuolen (LIGNITZ, 1960). Die Verlagerung von Hauptstückanteilen in die Kapselräume der Glomerula (sogenannter "infraglomerulärer Epithelreflux" nach WAUGH und BESCHEL, 1961), sowie Eiweißniederschläge in den Hauptstücken beobachteten u.a. HOLLE und Mitarbeiter (1955), RUDOLPH und SCHOLL, (1958), wie auch LIGNITZ (1960). Kernpyknosen wurden von BURWELL (1955), HOLLE und Mitarbeiter (1955), GAVAN und KAUFMAN (1956), SHEEHAN und DAVIS (1958), RUDOLPH und SCHOLL (1958) und LIGNITZ (1960) beschrieben. Dagegen wurde eine gesteigerte Anfärbbarkeit des Cytoplasmas der Tubulusepithelien in einer zunehmend breiter werdenden Zone der Infarktperipherie in den Frühstadien der Ischaemie kaum beachtet, was wohl nicht zuletzt daran lag, daß die Untersuchungen fast ausschließlich am fixierten Material erfolgten, in dem sich derartige Veränderungen nicht oder nur verhältnismäßig spät und schwach darstellen.

F l u o r e s z e n z m i k r o s k o p i s c h hob sich bereits

30 Minuten nach der Unterbindung das ischaemische Gebiet im Rindenbereich durch eine gleichmäßige braunrötliche Sekundärfluoreszenz der Hauptstückepithelien verhältnismäßig gut von den durchbluteten Anteilen ab.

Nach 1 Stunde war diese Farbänderung noch deutlicher ausgeprägt. Normalerweise im Cytoplasma der Haupstückepithelien vorkommende Granula stellten sich jetzt nur noch sehr vereinzelt dar.

Nach 2 Stunden zeigten die Hauptstückepithelien in einer schmalen peripheren Zone des ischaemischen Gebietes bei einer homogenen oder scholligen Beschaffenheit des Cytoplasmas eine grüne Sekundärfluoreszenz. Gleichzeitig hatte die Intensität der Kernfluoreszenz abgenommen. In den übrigen Infarktabschnitten besaßen die Hauptstückepithelien weiterhin eine braunrote Sekundärfluoreszenz.

Nach 3 Stunden konnte auch in allen übrigen Zellkernen in der ischaemischen Zone eine Abnahme der Sekundärfluoreszenz festgestellt werden.

Nach 4 Stunden hatte sich die an der Peripherie gelegene Zone mit grün leuchtenden Hauptstückepithelien wesentlich verbreitert. Hier stellten sich in den Zellen nur noch selten Kerne dar. Im Zentrum besaßen die Tubulusepithelien weiterhin eine braunrote Cytoplasmafluoreszenz. Im angrenzenden, sonst nicht geschädigten Nierenparenchym waren die Tubulusepithelien feintropfig verfettet.

Nach 6 Stunden ließ sich auch in den peripher gelegenen Tubuli der ischaemischen Markzone eine grüne Cytoplasmafluoreszenz nachweisen.

Nach 8 Stunden stellten sich die geschädigten Tubuli in einer breiten peripheren Zone nur noch als homogene grüne Bänder dar, die oft die Verbindung zur Basalmembran verloren hatten. Die Verfettung im angrenzenden Nierenparenchym hatte zugenommen.

Es zeigte sich also, daß fluoreszenzmikroskopisch nach einer Acridinorange-Fluorochromierung die Hauptstückepithelien im ischaemischen Gebiet zunächst eine gleichmäßig braunrote Sekundärfluoreszenz aufwiesen. Nach 2 Stunden war dagegen zunächst in der Peripherie der Rinde, später auch des Markes in einer zunehmend breiten Zone eine Änderung der Cytoplasmafluoreszenz nach grün festzustellen. Diese Befunde zeigen eine gewisse Übereinstimmung zu den Ergebnissen von MOLZ (1956). Auch hier konnten nach einer zweistündigen Ligatur im geschädigten Gebiet teils grün, teils rötlich gefärbte Epithelzellen nachgewiesen werden.

Überblickt man die an unfixierten Schnitten mit der Haematoxylin-Eosin-Färbung gewonnenen Ergebnisse mit den Befunden nach einer Acridinorange-Fluorochromierung, so ergibt sich eine gewisse Übereinstimmung. Wie beschrieben zeigte eine Stunde nach der Unterbindung die von der Ischaemie betroffene Zone lichtoptisch eine verminderte Cytoplasmaeosinophilie der Hauptstückepithelien. Gleichzeitig fiel hier fluoreszenzmikroskopisch ein Farbumschlag nach braunrot auf. Nach einer Ischaemie von mehr als 2 Stunden stellte sich dagegen lichtoptisch an der Peripherie eine zunehmend breiter werdende Zone dar, in der die Hauptstückepithelien jetzt eine gesteigerte Cytoplasmaeosinophilie aufwiesen. Fluoreszenzmikroskopisch leuchteten in diesem Abschnitt die Hauptstückepithelien jetzt grün. Die beschriebenen Farbveränderungen waren fluoreszenzmikroskopisch wesentlich deutlicher ausgeprägt als lichtoptisch, so daß mit dieser Methodik bereits frühzeitig eine sichere Abgrenzung der ischaemischen Zone vom übrigen Nierenparenchym möglich war.

B) Welche Übereinstimmungen bestehen zu fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen am experimentellen Herzinfarkt?

Vergleicht man die an der Niere gewonnenen Untersuchungsergebnisse mit entsprechenden Beobachtungen am Herzmuskel, so ergibt sich, daß auch im Herzen bereits frühzeitig in einem ischaemisch geschädigten Gebiet eine Abnahme der Cytoplasmaeosinophilie festgestellt werden konnte, die nach 2 bis 3 Stunden durch eine von Rande her einsetzende gesteigerte Eo -

sinophilie ersetzt wurde. Gleichzeitig trat auch in den Herzmuskelzellen, die normalerweise eine gelborangefarbene Sekundärfluoreszenz zeigen, ein deutlicher Farbumschlag nach grün ein (HECHT, KORB und DAVID, 1961; KORB und TOTOVIC, 1963; KORB, 1964). Im Gegensatz zu den Nierenbefunden konnte jedoch im Herzmuskel während der ersten Stunden an keiner Stelle eine Änderung der Sekundärfluoreszenz nach braunrot nachgewiesen werden.

C) Welche Schlüsse lassen sich aus der veränderten Anfärbbarkeit des Cytoplasmas während der Entstehung einer ischaemischen Infarktnekrose in der Niere ziehen?

Zum besseren Verständnis der fluoreszenzmikroskopischen Befunde soll an dieser Stelle zunächst kurz auf die Theorie der Acridinorange-Fluorochromierung eingegangen werden.

Acridinorange ist ein wasserlöslicher basischer Fluoreszenzfarbstoff. Er ist in saurer und neutraler Lösung mit einem Maximum bei pH 6,5 dissoziiert (KÖLBEL, 1947). Die Dissoziationskurve fällt jenseits von pH 8,0 steil ab, so daß ab pH 9,0 der Farbstoff nur noch in molekularer Form vorliegt. Während die Moleküle lipophile Eigenschaften haben, sind die Kationen im sauren und neutralen Bereich hydrophil. Basische Acridinorange-Lösungen fluoreszieren unabhängig von der Konzentration bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht gelbgrün. Dagegen weist die Fluoreszenz von Lösungen, in denen die dissoziierte Form überwiegt, bei niedriger Konzentration (1 : 100 000) eine grüne, bei hoher Konzentration (1 : 100) eine rote Fluoreszenz auf. Dieser "Konzentrationseffekt" wurde zuerst von STRUGGER (1949) beschrieben. Aus diesen Untersuchungen ergibt sich zwangsläufig, daß Zell- und Gewebselemente, die zahlreiche Acridinorange-Kationen binden, rot fluoreszieren. Strukturen, die dagegen nur wenige Kationen binden, leuchten grün. Da das Acridinorange zur Gruppe der basischen Fluorochrome gehört, erfolgt die Bindung in erster Linie an freie saure Valenzen. Es besteht eine besondere Affinität zu Ribonucleinsäuren und sauren Mucopolysacchariden. Die Anlagerung kann auf verschiedene Weise erfolgen:
1. Elektrostatisch unter Bildung salzartiger Komplexe,

2. durch Oberflächenadsorption und
3. durch Ionenaustausch an amphotere Eiweiße (STRAUB, 1965).

Aufgrund dieser Angaben kann angenommen werden, daß sich eine Acridinorange-Färbung dazu eignet, einen veränderten Gewebs-pH-Wert durch eine unterschiedliche Sekundärfluoreszenz anzuzeigen. Dabei wird ein zunehmend saurer Gewebs-pH-Wert - entsprechend dem Konzentrationseffekt - eine rötliche Sekundärfluoreszenz, ein basischer Gewebs-pH-Wert dagegen eine grüne Sekundärfluoreszenz zur Folge haben.

Gleiches gilt auch für das Eosin. Eosin gehört zur Gruppe der sauren Farbstoffe. Hier ist also zu erwarten, daß eine Änderung des Gewebs-pH-Wertes zur sauren Seite mit einer verminderten, eine Änderung zur alkalischen Seite dagegen mit einer gesteigerten Anfärbbarkeit beantwortet wird.

Überträgt man diese theoretischen Erwägungen auf die an den Niereninfarkten erhobenen Befunde, so zeigt sich, daß im ganzen Ischaemiebereich während der ersten beiden Stunden nach der Ligatur insbesondere in den Hauptstückepithelien eine Ansäuerung stattfindet, die durch eine braunrote Acridinorange-Fluoreszenz und eine verminderte Eosinophilie gekennzeichnet ist. Danach tritt von der Peripherie her in einer allmählich breiter werdenden Zone eine Umwandlung des Zell-pH-Wertes zur alkalischen Seite hin ein. Hier weisen die Epithelien jetzt eine grüne Acridinorange-Fluoreszenz und eine gesteigerte Eosinophilie auf. Damit werden gleichzeitig mit anderen Methoden gewonnene gleichsinnige Ergebnisse (BAYERLE und BORGER, 1939; GOEBEL und PUCHTLER, 1954) bestätigt.

Die initiale Ansäurung in den geschädigten Zellen ist nach übereinstimmenden Angaben in erster Linie durch eine Ansammlung saurer Stoffwechselprodukte in Verbindung mit einer anaeroben Glykolyse (HOLLE und Mitarbeiter, 1955; LEUTHARDT, 1961), aber auch durch eine Zerstörung von Ribonucleinkomplexen bedingt. Entsprechende Veränderungen sind gleichzeitig auch für eine postmortale Autolyse kennzeichnend.

Die vom Rande her einsetzende Alkalisierung ist nur dort zu beobachten, wo absterbendes Gewebe Kontakt mit lebendem Gewebe hat. Man nimmt daher an, daß die Alkalisierung durch ei-

nen Einstrom von Blutplasmabestandteilen aus dem nicht geschädigten Bezirk hervorgerufen wird. Diesen Vorgang bezeichnete RÖSSLE (1933) als Heterolyse. Wahrscheinlich wird durch diesen Einstrom von Blutplasmabestandteilen zunächst eine Neutralisation des sauren Gewebs-pH-Wertes hervorgerufen, was eine Hemmung proteolytischer Fermente zur Folge hat. Beim Zustandekommen des danach beobachteten alkalischen pH-Wertes sollen Calcium-Ionen maßgeblich beteiligt sein (BAYERLE und BORGER, 1939). Gleichzeitig tritt durch diese Vorgänge eine Cytoplasmagerinnung (Koagulation) ein.

V. Zusammenfassung

An Rattennieren wurde die Entstehung einer ischaemischen Infarktnekrose während eines Zeitraumes von 3o Minuten bis 8 Stunden nach Unterbrechung der Blutversorgung licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei konnte einmal nachgewiesen werden, daß innerhalb der Infarktnekrose bereits nach 2 Stunden beginnend und später zunehmend deutlicher Unterschiede zwischen der Infarktperipherie und dem Zentrum auftreten, die unter anderem auf Änderungen des Gewebs-pH-Wertes zurückzuführen sind. Während in den ersten beiden Stunden im gesamten Infarkt eine Verschiebung zur sauren Seite vorliegt, tritt danach von der Peripherie her in einer allmählich breiter werdenden Zone eine Änderung zur alkalischen Seite ein. Mit einer Acridinorange-Fluorochromierung werden diese Vorgänge durch einen unterschiedlichen Ausfall der Sekundärfluoreszenz wesentlich deutlicher dargestellt als mit üblichen lichtmikroskopischen Methoden. Gleichzeitig lassen sich - ähnlich wie im Herzmuskel - auch in der Niere ischaemische Infarkte durch eine Acridinorange-Fluorochromierung früher als lichtmikroskopisch erfassen.

Literatur

ARMSTRONG, A. — Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence
Exp. Cell Res., 11, 640-643, (1956)

BAYERLE, H. und G. BORGER — Über die Alkalisierungsvorgänge im nekrotischen Gewebe
Beitr.path.Anat., 103, 215-225, (1939)

BURWELL, H.J. — Changes in the proximate tubule of the rabbit kidney after temporary complete ischaemia
J.Path.Bact., 70, 387-399, (1955)

DECKART, H. und G. KORB — Fluorochromierung mit Acridinorange und Koriphosphin in Abhängigkeit vom pH-Wert der Farblösungen und der Vorbehandlung der Schnitte am Beispiel der normalen Rattenniere
Z.med. Labortechnik, 3, 251-259, (1962)

EDER, M. und U. WAGENMANN — Bedeutung und Problematik histochemischer Befunde am Niereninfarkt
Beitr.path.Anat., 121, 40-49, (1959)

GAVAN, T.L. und N. KAUFMAN — Experimental renal infarction - II. Histochemical, fatty, and morphological changes
Arch.Path. Chicago, 62, 386-390, (1956)

GOEBEL, A. und H.PUCHTLER — Über das Verhalten der histochemisch nachweisbaren alkalischen Phosphatase und 5-Nukleotidase im O_2 Mangel und im Niereninfarkt
Virch.Arch.path.Anat., 326, 119-134 (1954)

HECHT, A., G.KORB und H. David — Vergleichende histochemische, fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes bei der Ratte
Virch.Arch.path.Anat., 334, 265-281, (1961)

HOLLE, G., R.BURCKHARDT, S.ARNDT und M.BLÖDORN — Über manometrische, histochemische, histologische und pahsenoptische Befunde bei ischaemischer Hypoxydose - Beitrag zur Morphogenese und zur Frage des örtlichen Gewebetodes
Virch.Arch.path.Anat., 327, 150-205, (1955)

KÖLBEL, H. — Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle
Z.f. Naturforschung, 26, 382 - 392, (1947)

KORB, G. — Morphologische Untersuchungen an Herzmuskelnekrosen
Habilitationsschrift, Marburg 1964

KORB, G. und V. TOTOVIĆ — Licht- und fluoreszenzmikroskopische Befunde am Herzmuskel nach einer akuten, kurzfristigen Coronarinsuffiziens
Virch.Arch.path.Anat., 336, 475-484, (1936)

KORB, G., A.KRUG und H.BECHTELSHEIMER — Fluorochromierungsstudien zur Darstellung der normalen und gestörten Herzmuskeldurchblutung in Schnittpräparaten
Beitr. path.Anat., 131, 281-289, (1965)

LEUTHARDT, F. — Anaerobe Glykolyse
In: Lehrbuch der Physiologischen Chemie, 14. Aufl., 281-282, (1959)

LIGNITZ, W. — Histologische und histochemische Untersuchungen bei Dauerischaemie und nach vorübergehender Ischaemie der Rattenniere
Inaugural-Dissertation, Würzburg 1960

MOLZ, G. — Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen experimenteller hypoxämischer Nierenschädigung
Virch.Arch.path.Anat., 328, 111-120, (1956)

MÜLLER, R. — Über feinere gewebliche Veränderungen bei der Gerinnungsnekrose und Autolyse, untersucht am Niereninfarkt
Ffm.Z.Path., 52, 433-447, (1938)

RIBBERT, H. — Beiträge zur Kenntnis des Niereninfarktes
Virch.Arch.path.Anat., 155, 201-219, (1899)

RÖSSLE, R. — Über Veränderungen der Leber bei der Basedow'schen Krankheit und ihre Bedeutung für die Entstehung anderer Organsklerosen
Virch. Arch.path.Anat., 291, 1-46, (1933)

RUDOLPH, G. und O. SCHOLL — Histochemische Untersuchungen zum Fermenthaushalt des experimentellen Niereninfarktes
Beitr.path.Anat., 119, 13-44, (1958)

SHEEHAN, H.L. and J.C. DAVIS — Complete permanent renal ischaemia
J.Path.Bact., 76, 569-587, (1958)

SHEEHAN, H.L. and J.C. DAVIS — Patchy permanent renal ischaemia
J.Path.Bact., 77, 33-48, (1959)

SCHÜMMELFEDER, N. — Strukturveränderungen des Protoplasmas bei dem Absterben der Zelle
Verh.Dt.Ges.Path., 33, 65-69, (1949)

STRAUB, K. — - siehe nächste Seite -

STRAUB, K. Einflüsse von Milieufaktoren auf die Sekundärfluoreszenz der Kerne von Herzmuskelzellen bei der Färbung mit Acridinorange Inaugural-Dissertation, Marburg 1965

STRUGGER, S. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie Hannover: M. und H. Schaper, (1949)

TOTOVIĆ, V. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Verhalten der Hauptstückepithelien beim experimentellen Niereninfarkt der Ratte Virch.Arch.path.Anat., 340, 251-269, (1966)

TÜRK, M. Über die Degeneration der Nierenzellen bei dauerndem Abschluß der Zirkulation - Untersuchungen mit vitaler Färbung Beitr.path.Anat., 56, 325-345, (1913)

WAUGH, D. and A. BESCHEL Infraglomerual epithelial reflux in the evolution of serotonin nephropathy in rats Am.J.Path., 39, 547-560, (1961)

Lebenslauf

von Dietmar R u n g e

Am 5. Jan. 1939 wurde ich als Sohn des Lehrers Paul Runge und seiner Ehefrau Hertha, geb. Wilhelms, in Höver (Kreis Uelzen) geboren.

Im Herbst 1946 erfolgte die Einschulung in die Grundschule in Höver.
195o besuchte ich ab Ostern die Mittelschule in Bevensen. Bedingt durch eine Versetzung meines Vaters nach Veerßen (Uelzen) besuchte ich 195o die Mittelschule in Uelzen. Im gleichen Jahr bestand ich die Aufnahmeprüfung für die Herzog-Ernst-Schule in Uelzen. Am 5. März 196o legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Mein Medizinstudium begann im Sommer-Semester 196o an der Philipps-Universität in Marburg. Am 4. März 1961 bestand ich dort das Vorphysikum, am 25. Oktober 1962 das Physikum. Zum 7. Semester immatrikulierte ich mich an der Universität Freiburg, kehrte jedoch im Winter-Semester 1963/64 nach Marburg zurück und begann im Pathologischen Institut meine Doktorarbeit.

Nach dem 11. Semester meldete ich mich in Marburg zum medizinischen Staatsexamen, das ich am 21. Feb. 1966 bestand. Meine Medizinalassistentenzeit begann am 1. Mai 1966 im Pathologischen Institut der Universität Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren
die Herren Professoren und Dozenten:

In Marburg:

Bücher, Dimroth, Drawert, Gedigk, Hensel,
Huber, Lang, Mahr, Marx, Niessing, Overbeck,
Petry, Rodeck, Seidel, Siegert, Schmid,
Schölmerich, Schwaiger, Vogt, Walcher,
Wendt, Würterle,

in Freiburg:

Bätzner, Büchner, Creutzfeld, Giertz,
Haas, Hahn, Heilmeyer, Hummel, Krauß,
Lorenz, Rehm, Schirrmeister, Stutz,
Wimhöfer,

in Marburg:

Beckmann, Behrend, Berendes, Braun-Falco,
Cleve, Deicher, Döile, Hardewig, Hartmann,
Hildebrandt, Jacob, Knauff, Korb, Krönke,
Kurz, Linneweh, Martini, Neubauer, Oehmig,
Petzhold, Poetschke, Salfeld, Sauer,
Straub, Streicher, Schiff, Schleyer,
Schürmann.

ROTAPRINT-OFFSETDRUCKEREI

Klein

6602 Dudweiler · Scheidter Straße 26
Telefon Sulzbach 7 32 84
Drucksachen aller Art · Fotokopien
Spezialgebiet: Druck v. Dissertationen